

МГУ имени М.В. Ломоносова

Отдел взаимодействия вирусов с клеткой

№ госрегистрации
АААА-А17-117120570012-1

УТВЕРЖДАЮ
Директор/декан

«__» _____ Г.

УДК
575.28 Рекомбинации и мутации у вирусов
578 Вирусология
578.2 Молекулярная вирусология
616-036.22 Эпидемии. Эпидемиология

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

по теме:

Изучение основных закономерностей взаимоотношения структуры и
экспрессии генома пикорнавирусов
(промежуточный)

Зам. директора/декана
по научной работе

«__» _____ Г.

Руководитель темы
Дмитриев С.Е.

«__» _____ Г.

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы:
заведующий отделом, кандидат биологических наук _____ (Дмитриев С.Е.)

Исполнители темы:

инженер 2 категории	_____	(Головко В.А.)
техник	_____	(Гробушкин П.А.)
ведущий инженер	_____	(Едакин Р.О.)
инженер 2 категории	_____	(Екамасов Н.Н.)
техник	_____	(Замятнина К.А.)
ведущий инженер	_____	(Иванов Л.А.)
инженер 2 категории	_____	(Кац Л.М.)
техник	_____	(Климова М.Е.)
ведущий инженер	_____	(Кметь В.А.)
инженер 2 категории, кандидат биологических наук	_____	(Коноплева М.В.)
научный сотрудник, кандидат биологических наук	_____	(Короткова Е.А.)
научный сотрудник, кандидат биологических наук	_____	(Красота А.Ю.)
	_____	(Кущенко А.С.)
младший научный сотрудник	_____	(Лашкевич К.А.)
инженер 2 категории	_____	(Новикова Г.В.)
инженер 2 категории	_____	(Нурмухомятова Э.Р.)
ведущий инженер	_____	(Самарский А.Е.)
инженер 2 категории	_____	(Строколист В.В.)
старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	_____	(Тышковский А.Э.)
инженер 2 категории	_____	(Щербаков М.Е.)

РЕФЕРАТ

Ключевые слова:

рнк-содержащие вирусы, молекулярная эпидемиология, пикорнавирусы, вирус полиомиелита, рнк-рекомбинация, эволюция рнк-вирусов, репликация рнк-геномов, взаимодействие вируса и клетки, молекулярно-эпидемиологический мониторинг циркуляции ряда вирусов человека, врожденный клеточный иммунитет, секьюрити-белки, вирус-индуцированная патология, регуляция репликации пикорнавирусных геномов, молекулярная эпидемиология полиомиелита

Ключевые слова по-английски:

rna recombination, replication of rna genomes, virus-cell interactions, molecular epidemiology, poliovirus, rna-containing viruses, evolution of rna viruses, picornaviruses, molecular-epidemiological monitoring of the circulation of a number of viruses of human, innate cellular immunity, security-proteins, virus-induced pathology, and molecular epidemiology of poliomyelitis, regulation of replication of picornavirus genomes

В 2023 году в Отделе взаимодействия вирусов с клеткой НИИ ФХБ МГУ были проведены работы по трём направлениям: изучение молекулярных механизмов вирусных инфекций, изучение механизмов биосинтеза белка и биология старения. На основе ранее полученной нами линии клеток, дефектных по синтезу гепарансульфатов, проведены CRISPR-скрининги, направленные на поиск генов, необходимых для продуктивной инфекции несколькими флавивирусами (которые используют гепарансульфаты для первичной адсорбции, в том числе вирусом японского энцефалита, JEV, и вирусом лихорадки Западного Нила, WNV). Продолжено изучение роли белка ITAF45 в инфекции пикорнавирусом EMCV (вирус энцефаломиокардита). По следующему направлению также проведён ряд исследований и опубликованы статьи. Показана локализация факторов терминации трансляции и факторов рециркуляции рибосом в стресс-гранулах при окислительном стрессе, а также повышенная частота сквозных прочтений стоп-кодона и реинициации в этих же условиях. Показано, что одиночная остановившаяся на мРНК 80S рибосома предотвращает вовлечение мРНК в стресс-гранулы. С помощью биоинформатического анализа большого количества публично доступных данных изучен состав факторов трансляции в человеческих органах и тканях. Продолжена поддержка базы данных EuPSIC, содержащей информацию об ингибиторах эукариотической трансляции (<https://eupsic.belozersky.msu.ru/>) – на данный момент база данных включает сведения о 450 химических соединений. Осуществлена успешная доставка в организм мышей гена однодоменных антител против ботулинического нейротоксина А с использованием разработанной универсальной платформы для мРНК-терапии, что обеспечило защиту мышей от летальных доз нейротоксина. Наибольшее же число сильных публикаций принесли проекты в области биологии старения. В журнале Cell вышли результаты большого исследования различий в механизмах долголетия у разных видов млекопитающих (а также внутри видов) и их связи со старением. В журнале Nature вышла работа, в которой показано, что повышенное содержание гиалуронана у голого землекопа улучшает продолжительность здоровья мышей. В других работах изучены последствия долгосрочного гетерохронно-

го парабиоза (хирургического соединения кровотоков старых и молодых мышц); показано, что биологический возраст увеличивается при стрессе и восстанавливается при выздоровлении; что снижение регуляции митохондриального метаболизма является причиной быстрой потери скелетных мышц во время старения у мышей; что ускоренная элонгация транскрипции во время старения уменьшает продолжительность жизни; что терапия сенолитиками облегчает физиологическое старение мозга человека и невропатологию, вызванную COVID-19; что рилменидин продлевает продолжительность жизни и здоровье *Caenorhabditis elegans* посредством нишарин-11-имидазолинового рецептора; изучены эффекты химически индуцированного репрограммирования клеток на их эпигенетический возраст.

ВВЕДЕНИЕ

Недавняя пандемия COVID-19 наглядно показала, что мы по-прежнему не обладаем достаточным уровнем знаний о вирусных инфекциях. Тщательное и всестороннее изучение молекулярных механизмов, лежащих в их основе, способно помочь лучше разобраться как в вирусных, так и в клеточных молекулярных процессах. В Отделе взаимодействия вирусов с клеткой НИИ ФХБ мы стараемся совмещать направления, связанные с молекулярной вирусологией, и ещё два не менее интересных направления (с которыми зачастую возникают тематические и методические пересечения, ведущие к синергии): изучение механизмов биосинтеза белка и биологию старения. В отделе работают высококлассные специалисты во всех этих областях, что позволяет проводить мультидисциплинарные изыскания с применением широкого арсенала современных методов молекулярной, клеточной и системной биологии, вирусологии и биохимии, а также проводить исследования в смежных направлениях с применением биоинформатических подходов.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Направление «Молекулярная вирусология». В 2023 году были продолжены работы, связанные с применением CRISPR/Cas-опосредованных генетических скринингов для изучения молекулярных механизмов вирусных инфекций – поиск генов, необходимых для эффективного прохождения жизненного цикла различных вирусов в клетках млекопитающих. Было проведено несколько новых скринингов на клетках линии HEK293T, мутантных по гену синтеза гепарансульфатов, с несколькими флавивирусами, использующими гепарансульфаты для первичной адсорбции - в том числе с вирусом японского энцефалита (JEV) и вирусом лихорадки Западного Нила (WNV). Выявлены интересные хиты – в частности, в случае JAV – ген SLC39A8, кодирующий транспортер ионов цинка. Возможно, вирус JEV после первичной адсорбции на остатках гепарансульфата использует именно этот мембранный белок, чтобы непосредственно проникнуть в клетку. Эта находка требует верификации и дальнейшего исследования. Кроме того, было продолжено изучение роли белка ITAF45 в инфекции пикорнавирусом EMCV (вирус энцефаломиокардита мышей). Этот белок является ITAF – т.е. РНК-связывающим белком, необходимым для работы IRES-элемента (сайта внутренней посадки рибосомы) близкородственного вируса FMDV (вирус ящура), однако в литературе неоднократно заявлялось, что для работы IRES-элемента EMCV он не нужен. Однако опыты были поставлены в искусственной *in vitro* системе, где отсутствовало большинство клеточных компонентов. Мы же показали, что для развития продуктивной инфекции EMCV в живой клетке этот белок абсолютно необходим (клетки, нокаутные по гену этого белка, были полностью устойчивы к вирусу). Выяснение молекулярного механизма, лежащего в основе этого явления, мы сейчас активно занимаемся.

2. По направлению «Молекулярные механизмы биосинтеза белка» также проведён ряд исследований и опубликованы статьи. Две из них посвящены изучению так называемых стресс-гранул – РНК-белковых конденсатов, образующихся в клетке в условиях клеточного стресса. Нам удалось показать локализацию факторов терминации трансляции и факторов рециркуляции рибосом в стресс-гранулах при окислительном стрессе, а также повышенную частоту сквозных прочтений стоп-кодона и реинициации в этих же условиях. Пока остаётся открытым вопрос, связано ли одно наблюдение с другим – мы собираемся исследовать этот вопрос, применив методику CRISPR/Cas-опосредованного генетического скрининга. В другой работе, применив неканонические рибосомные ингибиторы, останавливающие движение одной рибосомы по мРНК, но не влияющие на другие (благодаря чему на большинстве мРНК в клетке остаются одиночные остановившиеся 80S рибосомы), мы показали, что одна-единственная 80S рибосома на мРНК полностью предотвращает вовлечение мРНК в стресс-гранулы. Это незначительное, казалось бы, наблюдение интересно тем, что оно не укладывается в существующую сейчас концепцию, объясняющую механизм формирования стресс-гранул при стрессе (связанную с простым «слипанием» протяжённых участком мРНК, освобождённых от рибосом, друг с другом и с белками). Вместо этой концепции мы предлагаем другую, подразумевающую активную роль рибосомной 40S субчастицы, связанной с мРНК (и её поверхности, недоступной в целой 80S рибосоме), в вовлечении мРНК в стресс-гранулы. Помимо этих двух работ, были опубликованы и другие. Так, с помощью био-

информатического анализа большого количества публично доступных данных (в частности, из крупнейшей транскриптомной базы GTEx) был изучен состав факторов трансляции в человеческих органах и тканях и выявлены факторы, имеющие яркую тканеспецифичную представленность. Продолжена поддержка и наращивание содержимого базы данных об ингибиторах эукариотической трансляции EuPSIC (<https://eupsic.belozersky.msu.ru/>), которая на данный момент включает информацию о 450 веществах. Отдельного внимания заслуживает работа, имеющая «полуприкладное» значение. Она связана с развитием технологий мРНК-терапии, набирающей обороты во всём мире. В частности, за один из аспектов этой технологии в 2023 году была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине. Тем не менее, в России эти технологии пока не развиты. Мы вот уже на протяжении едва ли не 20 лет используем доставку мРНК для изучения биосинтеза белка – поэтому естественным шагом для нас было подключиться к этой гонке. В сотрудничестве с НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи нам удалось создать отечественную платформу для мРНК-терапии и осуществить с помощью неё успешную доставку в организм мышей мРНК, кодирующей однодоменные антитела против ботулинического нейротоксина А, что обеспечило защиту мышей от летальных доз нейротоксина. В дальнейшем мы продолжим работу над фундаментальными принципами, которые позволили бы улучшить эту универсальную платформу для мРНК-терапии. 3. Направление «Биология старения». Это направление принесло отделу наибольшее число сильных публикаций в 2023 году. Все они сделаны в сотрудничестве с Гарвардской школой медицины нашим старшим научным сотрудником Александром Тышковским. Здесь я ограничусь лишь кратким перечислением сделанных находок, поскольку все эти статьи находятся в полном доступе и с ними можно ознакомиться (см. список в разделе «Заключение»). Так, в журнале Cell вышли результаты большого исследования межвидовых и внутривидовых различий в механизмах долголетия у млекопитающих и их связи со старением. Этот проект был в основном биоинформатическим. В результате были получены транскрипционные сигнатуры старения и долголетия, которые можно использовать для поиска воздействий, потенциально продлевающих жизнь. Далее, в журнале Nature вышла работа, в которой было показано, что повышенное содержание гиалуронана у голого землекопа улучшает продолжительность здоровья мышей. В других работах были изучены последствия долгосрочного гетерохронного парабиоза (хирургического соединения кровотоков старых и молодых мышей); было показано, что биологический возраст увеличивается при стрессе и восстанавливается при выздоровлении; что снижение регуляции митохондриального метаболизма является причиной быстрой потери скелетных мышц во время старения у мышей; что ускоренная элонгация транскрипции во время старения уменьшает продолжительность жизни; что терапия сенолитаками облегчает физиологическое старение мозга человека и невропатологию, вызванную COVID-19; что рилменидин продлевает продолжительность жизни и здоровье *Caenorhabditis elegans* посредством нишарин-11-имидазолинового рецептора. Кроме того, были изучены эффекты химически индуцированного репрограммирования клеток на их эпигенетический возраст – что даёт ключ к поиску механизмов омоложения клеток во взрослом организме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённая работа позволила получить новые знания о механизмах вирусных инфекций, биосинтеза белка и биологии старения. По результатам работы нам удалось опубликовать ряд научных статей, опубликованных в отечественных и международных журналах:

1. Relocalization of Translation Termination and Ribosome Recycling Factors to Stress Granules Coincides with Elevated Stop-Codon Readthrough and Reinitiation Rates upon Oxidative Stress. Makeeva DS, Riggs CL, Burakov AV, Ivanov PA, Kushchenko AS, Bykov DA, Popenko VI, Prassolov VS, Ivanov PV, Dmitriev SE. *Cells* (IF: 4.37; Q4). 2023 Jan 8;12(2):259. doi: 10.3390/cells12020259.
2. A Solitary Stalled 80S Ribosome Prevents mRNA Recruitment to Stress Granules. Fedorovskiy AG, Burakov AV, Terenin IM, Bykov DA, Lashkevich KA, Popenko VI, Makarova NE, Sorokin II, Sukhinina AP, Prassolov VS, Ivanov PV, Dmitriev SE. *Biochemistry (Mosc)* (IF: 2.85; Q2 Scopus). 2023 Nov;88(11):1786-1799. doi: 10.1134/S000629792311010X.
3. Cell death or survival: Insights into the role of mRNA translational control. Bhattar N, Dmitriev SE, Ivanov P. *Semin Cell Dev Biol* (IF: 7.73; Q1). 2024 Feb 15;154(Pt B):138-154. doi: 10.1016/j.semcdb.2023.06.006. Epub Sep 2023
4. Human Tissues Exhibit Diverse Composition of Translation Machinery. Anisimova AS, Kolyupanova NM, Makarova NE, Egorov AA, Kulakovskiy IV, Dmitriev SE. *Int J Mol Sci* (IF: 4.56; Q1). 2023 May 6;24(9):8361. doi: 10.3390/ijms24098361.
5. Single-domain antibody delivery using an mRNA platform protects against lethal doses of botulinum neurotoxin A. Panova EA, Kleymenov DA, Shcheblyakov DV, Bykonia EN, Mazunina EP, Dzharullaeva AS, Zolotar AN, Derkaev AA, Esmagambetov IB, Sorokin II, Usachev EV, Noskov AN, Ivanov IA, Zatsepin TS, Dmitriev SE, Gushchin VA, Naroditsky BS, Logunov DY, Gintsburg AL. *Front Immunol* (IF: 7.56; Q1). 2023 Feb 14;14:1098302. doi: 10.3389/fimmu.2023.1098302.
6. Distinct longevity mechanisms across and within species and their association with aging. Tyshkovskiy A, Ma S, Shindyapina AV, Tikhonov S, Lee SG, Bozaykut P, Castro JP, Seluanov A, Schork NJ, Gorbunova V, Dmitriev SE, Miller RA, Gladyshev VN. *Cell* (IF: 41.58; Q1). 2023 Jun 22;186(13):2929-2949.e20. doi: 10.1016/j.cell.2023.05.002.
7. Increased hyaluronan by naked mole-rat Has2 improves healthspan in mice. Zhang Z, Tian X, Lu JY, Boit K, Ablava J, Zakusilo FT, Emmrich S, Firsanov D, Rydkina E, Biashad SA, Lu Q, Tyshkovskiy A, Gladyshev VN, Horvath S, Seluanov A, Gorbunova V. *Nature* (IF: 49.96; Q1). 2023 Sep;621(7977):196-205. doi: 10.1038/s41586-023-06463-0.
8. Multi-omic rejuvenation and life span extension on exposure to youthful circulation. Zhang B, Lee DE, Trapp A, Tyshkovskiy A, Lu AT, Bareja A, Kerepesi C, McKay LK, Shindyapina AV, Dmitriev SE, Baht GS, Horvath S, Gladyshev VN, White JP. *Nat Aging*. 2023 Aug;3(8):948-964. doi: 10.1038/s43587-023-00451-9.
9. Downregulation of mitochondrial metabolism is a driver for fast skeletal muscle loss during mouse aging. Fernando R, Shindyapina AV, Ost M, Santesmasses D, Hu Y, Tyshkovskiy A, Yim SH, Weiss J, Gladyshev VN, Grune T, Castro JP. *Commun Biol* (IF: 4.17; Q1). 2023 Dec 8;6(1):1240. doi: 10.1038/s42003-023-05595-3.
10. Senolytic therapy alleviates physiological human brain aging and COVID-19 neuropathology. Aguado J, Amarilla AA, Taherian Fard A, Albornoz EA, Tyshkovskiy A, Schwabenland M, Chaggar HK, Modhiran N, Gómez-Inclán C, Javed I, Baradar AA, Liang B, Peng L, Dharmaratne M, Pietrogrande G, Padmanabhan P, Freney ME, Parry R, Sng JDJ, Isaacs A, Khromykh AA, Valenzuela Nieto G, Rojas-Fernandez A,

Davis TP, Prinz M, Bengsch B, Gladyshev VN, Woodruff TM, Mar JC, Watterson D, Wolvetang EJ. *Nat Aging*. 2023 Dec;3(12):1561-1575. doi: 10.1038/s43587-023-00519-6. 11. Accelerated transcriptional elongation during aging impairs longevity. Tyshkovskiy A, Zhang S, Gladyshev VN. *Cell Res* (IF: 25.62; Q1). 2023 Nov;33(11):817-818. doi: 10.1038/s41422-023-00829-9. 12. Chemically induced reprogramming to reverse cellular aging. Yang JH, Petty CA, Dixon-McDougall T, Lopez MV, Tyshkovskiy A, Maybury-Lewis S, Tian X, Ibrahim N, Chen Z, Griffin PT, Arnold M, Li J, Martinez OA, Behn A, Rogers-Hammond R, Angeli S, Gladyshev VN, Sinclair DA. *Aging (Albany NY)* (IF: 5.68; Q2). 2023 Jul 12;15(13):5966-5989. doi: 10.18632/aging.204896. 13. Biological age is increased by stress and restored upon recovery. Poganik JR, Zhang B, Baht GS, Tyshkovskiy A, Deik A, Kerepesi C, Yim SH, Lu AT, Haghani A, Gong T, Hedman AM, Andolf E, Pershagen G, Almqvist C, Clish CB, Horvath S, White JP, Gladyshev VN. *Cell Metab* (IF: 27.29; Q1). 2023 May 2;35(5):807-820.e5. doi: 10.1016/j.cmet.2023.03.015. 14. Rilmenidine extends lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans* via a nischarin I1-imidazoline receptor. Bennett DF, Goyala A, Statzer C, Beckett CW, Tyshkovskiy A, Gladyshev VN, Ewald CY, de Magalhães JP. *Aging Cell* (IF: 9.3; Q1). 2023 Feb;22(2):e13774. doi: 10.1111/acel.13774.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
Объем финансирования темы в 2023 году
Таблица А.1

Источник финанси- рования	Объем (руб.)	
	Получено	Освоено собственными силами